

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Diversita a interakce mikrobů asociovaných se syndromem bílého nosu
netopýrů**

Diversity and interactions of microbes associated with White nose syndrome

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Anna Fabryová

Školitel: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12.08.2013

.....

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala především Mirku Kolaříkovi za vedení mé bakalářské práce, jeho všudypřítomnou trpělivost, shovívavost a cenné rady. Dále pak všem Chmelařům, zejména Nele a Tomášovi za rodinné zázemí, podporu a pečlivý dohled. V neposlední řadě také Janě za její společnost nejen v NTK a Kláře s Honzou za jejich rozhovory přínosné pro budoucí vědu. Závěrem pak ještě celé rodině za veškerou podporu.

Abstrakt

Syndrom bílého nosu je závažné onemocnění, které v nedávné době postihlo netopýří kolonie Spojených států a Kanady. U populací v daných oblastech vyvolává masivní úhyn těchto zvířat. Choroba je způsobena chladnomilnou houbou *Pseudogymnoascus destructans*, jež vytváří na postižených jedincích bílé povlaky, dle nichž byl tento syndrom pojmenován. Současné výzkumy ukazují, že růst *P. destructans* je nejspíše inhibován bakteriemi rodu *Pseudomonas*. Proto je tato práce dále zaměřena na shrnutí poznatků o interakcích hub a bakterií a zmiňuje významné antifungální látky rodu *Pseudomonas*.

Klíčová slova: *Pseudogymnoascus destructans*, psychrofilní houby, syndrom bílého nosu, interakce hub a bakterií, *Pseudomonas*

Abstract

White-nose syndrome is a severe disease of hibernating bats, which has been lately revealed among their colonies in United States and Canada. This infection causes extensive declines of bat populations in aforementioned area. Causative agent of this disease is a psychrophilic fungus *Pseudogymnoascus destructans*. The syndrome got its name according to a white fungal growth found on affected bats. Recently it has been shown that growth of *P. destructans* is probably inhibited by *Pseudomonas* bacteria species. In this work existing knowledges of bacterial-fungal interactions are summarized and significant antifungal metabolites of *Pseudomonas* species are exhibited.

Key words: *Pseudogymnoascus destructans*, psychrophilic fungi, white-nose syndrome, bacterial–fungal interactions, *Pseudomonas*

Seznam použitých zkratk

CFU	colony-forming unit	jednotka tvořící kolonie
CLSM	confocal laser scanning microscopy	konfokální laserová skenovací mikroskopie
ITS	internal transcribed spacer	vnitřní přepisovaný mezerník
HPLC	high performance liquid chromatography	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MEA	maltose extract agar	agar s maltózovým extraktem
MMN	modified Melin-Norkrans	modifikované médium dle Merlina a Norkranse
PLFA	phospholipid fatty acids	mastné kyseliny fosfolipidů
PQS	<i>Pseudomonas</i> quinolone signal	quinolonový signál pseudomonád
PYG	peptone yeast glucose	kvasnično-glukózový pepton
RPMI	Roswell Park Memorial Institue	médium dle institutu Roswell Park Memorial
SSU -PCR	small subunit–polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce genů malé ribozomální podjednotky
STR-PCR	short tandem repeats–polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce krátkých tandemových repetit
TSA	trypticase soy agar	tryptikáza-sójový agar
YMB	yeast mannitol broth	kvasnično-manitolový bujón
YPD	yeast peptone dextrose	kvasnično-dextrózový pepton
WNS	white-nose syndrome	syndrom bílého nosu

Obsah

1. Úvod	1
2. Syndrom bílého nosu	2
2.1. WNS v Americe	3
2.2. WNS v Evropě.....	3
3. Rod <i>Pseudogymnoascus</i>	5
3.1. <i>Pseudogymnoascus destructans</i>	5
3.2. Ostatní druhy rodu <i>Pseudogymnoascus</i>	6
4. Interakce hub a bakterií.....	7
4.1. Typy interakcí	8
4.1.1. Přímé působení extrolitů.....	8
4.1.2. Modifikace okolního prostředí	9
4.2. Metody studia interakcí	10
4.3. Diskuse k tabulce.....	11
5. Rod <i>Pseudomonas</i>	13
5.1. Vliv na ostatní organismy	13
5.2. Antifungálnísekundární metabolity	13
6. Závěr	15
7. Použitá literatura	16

1. Úvod

Mezi netopýřími populacemi Severní Ameriky se v posledních několika letech rozšířila závažná infekce. Podle bílých porostů na čumáku, uších a křídlech nakažených netopýřů dostala svůj název syndrom bílého nosu. Infekčním agens této choroby je chladnomilná houba *Pseudogymnoascus destructans*, která proniká do pokožky postižených zvířat a způsobuje v ní drobné léze.

Zatímco v USA a Kanadě vyvolala tato houba masivní vlny úhynu v rámci netopýřích populací a v současnosti se rozšiřuje do stále nových oblastí kolem místa propuknutí nákazy, v Evropě byla nalezena pouze ojediněle, bez smrtícího dopadu na netopýří kolonie. U několika nakažených kusů byla pouze zaznamenána snížená vitalita.

Mezi organismy jsou dobře známy různé typy interakcí a nejinak je tomu v případě hub a bakterií. Navzájem spolu kompetují, pomáhají si, ovlivňují vzájemně svou morfologii či fyziologii, působí na sebe změnou okolního prostředí, atd. Zejména v rostlinné říši jsou pak známy případy, kdy je prostřednictvím bakterií potlačena řada houbových nákaz, působením specifických antifungálních látek. Těmito látkami disponují také bakterie rodu *Pseudomonas* z nichž byly některé druhy nalezeny také v prostředí, kde se vyskytuje *P. destructans*. Bližší zkoumání tak může odhalit nové možnosti prevence a léčby infekce, která je touto houbou způsobována.

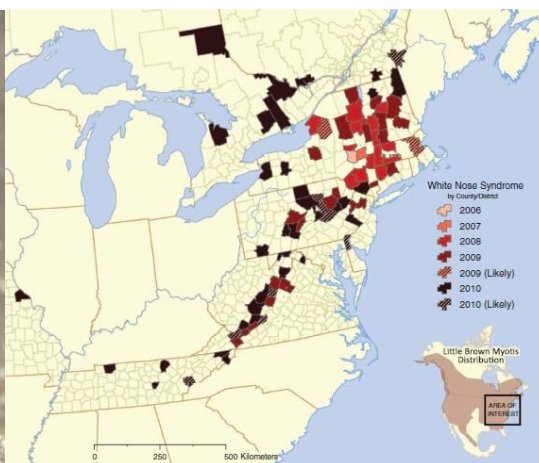
Tato práce si tedy klade za cíle shrnout dosavadní poznatky o syndromu bílého nosu a jeho původci, houbě *Pseudogymnoascus destructans*, představit nejdůležitější typy interakcí mezi houbami a bakteriemi, shrnout poznatky o důležitých metodách studia těchto interakcí a přiblížit rod *Pseudomonas* a jeho antifungální účinky.

2. Syndrom bílého nosu

Jako syndrom bílého nosu (WNS = white-nose syndrom) se označuje nedávno objevená choroba, která postihuje jeskynně žijící netopýry, u nichž způsobuje patologické změny, jež mohou vést až k úmrtí daných zvířat. Poprvé bylo toto onemocnění zjištěno a fotograficky zdokumentováno v roce 2006 na severovýchodě USA ve státě New York a vzápětí potvrzeno v dalších 33 okolních oblastech. Jméno získalo podle bílých houbových porostů, jež byly patrné na uších, křídlech a čeniších postižených netopýrů. Na histologických preparátech pak byla pozorována houbová infekce, pronikající do kůže netopýrů, vyplňující svými hyfami chlupové folikuly a přidružené mazové a potní žlázy (Blehert et al., 2009). Invazivita houbové nákazy se navíc liší od působení jiných dermatofytických hub, neboť na rozdíl od nich proniká až do hlubší vrstvy epidermis – do *stratum corneum* (Courtin et al., 2010).



Obr. 1: Netopýr nakažený geomykózou.
Převzato od Blehert a kol. (2009)



Obr. 2: Rozšíření nákazy v S Americe.
Převzato od Frick a kol. (2010)

Z několika amerických stanovišť pak byly na začátku roku 2008 sesbírány vzorky z netopýrů rodu *Myotis lucifugus* (netopýr hnědavý) a *Myotis septentrionalis*. Sekvenční analýzou SSU (= small subunit) a ITS (=internal transcribed spacer) rRNA bylo zjištěno, že jsou všechny izoláty totožné a byly zařazeny do rodu *Geomyces*. Morfologický popis však neodpovídal žádnému doposud popsanému druhu. Izoláty byly popsány jako nový druh *Geomyces destructans* (Gargas et al., 2009). V roce 2013 však byla houba přezkoumána a přejmenována na *Pseudogymnoascus destructans* (Minnis et al., 2013). Dle Chaturvediho a kol. (2011) je WNS někdy označován také jako geomykóza právě podle basionymu svého houbového původce.

Další případy WNS pak byly v USA v průběhu let potvrzeny i v dalších lokalitách okolo původního nálezu (Courtin et al., 2010) a postupně se rozšířil až do Kanady (Vanderwolf et al., 2012).

2.1. WNS v Americe

Na americkém kontinentě se nákaza *P. destructans* masivně rozšířila a způsobila úhyn již více než milionu netopýrů v četných zimovištích, přičemž některá dokonce téměř vyhubila (Blehert et al., 2009). Tamní vědci se proto právem obávají následků a začali důkladněji zkoumat přesný způsob, jakým netopýři této nákaze podléhají.

Ukázalo se, že vlastní houbový porost není pro netopýry smrtelný, ale poškození kůže a tkání narušuje jejich homeostázi – dochází k vyššímu výparu vody a dehydrataci – což způsobuje předčasné vzbuzení netopýrů z hibernace. Díky tomuto opakovanému buzení přicházejí o své nashromážděné tukové zásoby, v důsledku čehož umírají na energetické vyčerpání (Cryan et al., 2010), případně umrzají v okolí svých zimovišť ve snaze dohnat tyto ztráty lovem další kořisti (Reichard et Kunz, 2009).

Kromě značného úbytku některých populací dochází též díky vymírání k ohrožení několika druhů. Nejhuře je na tom malý netopýr *Myotis lucifugus* (netopýr hnědavý). Před propuknutím epidemie geomykózy byl vcelku běžným druhem, avšak nyní jeho počty rapidně poklesly a podle modelu, který navrhli Frick a kol.(2010), hrozí, že při stávající tendenci úbytku může dojít až k jeho úplné extinkci, a to již během následujících 16 let.

Není tedy divu, že američtí vědci zejména vyvíjejí snahu objevit nové způsoby, jimiž by zmírnili šíření nákazy, neboť množství účinných léčivých látek proti houbovým infekcím je dosud stále omezené. Látky jsou navíc často toxické napadenému organismu. A houbové vakcíny, jež by prošly schválením, chybí úplně (Blehert, 2012).

2.2. WNS v Evropě

Po masivním úhynu netopýrů, ke kterému došlo v USA, se začala této problematice věnovat také výzkumná pracoviště v Evropě. První evropský nález *Pseudogymnoascus destructans* byl zaznamenán ve Francii v březnu roku 2009 v oblasti Périgueux. Jeden netopýr velký (*Myotis myotis*) vykazoval známky bílého povlaku na čenichu a následná analýza rRNA tento nález jako *P. destructans* potvrdila. Další případy byly postupně

nalezeny v Maďarsku, Německu, Švýcarsku (Wibbelt et al., 2010), na Slovensku (Simonovicova et al., 2011) i v České republice (Martinkova et al., 2010; Pikula et al., 2012). Mezi napadenými druhy byly *Myotis blythii* (netopýr východní), *M. brandtii* (netopýr brantův), *M. dasycneme* (netopýr pobřežní), *M. daubentonii* (netopýr vodní), *M. emarginatus* (netopýr brvitý), *M. oxygnathus* (netopýr ostrouchý), *M. myotis* (netopýr velký) a *M. mystacinus* (netopýr vousatý). Nejčastější výskyt byl pozorován u *M. myotis* (Martinkova et al., 2010; Puechmaille et al., 2011; Simonovicova et al., 2011; Wibbelt et al., 2010).

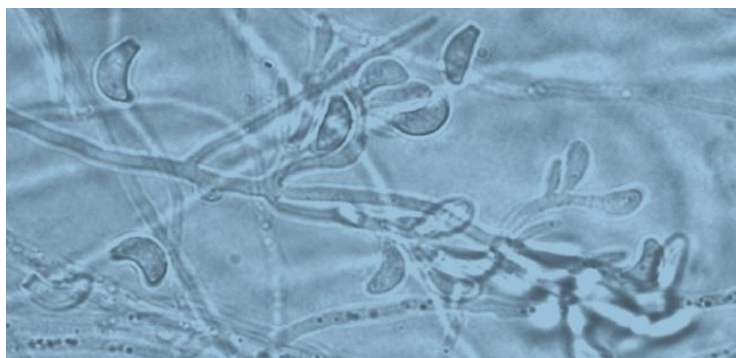
Francouzští vědci v čele s Puechmaille a kol. (2010) přišli s teoriemi, proč WNS nemá v Evropě tak ničivý dopad jako v USA. Podle první teorie k nám *Pseudogymnoascus destructans* přišla z Ameriky a nákaza se teprve začíná šířit evropským kontinentem. Druhá teorie naopak říká, že *P. destructans* byla původní v Evropě a zdejší netopýři se jí již stačili přizpůsobit. Tomu nasvědčují např. odlišné strategie hibernace. Zatímco v Evropě netopýři zimují jednotlivě či v malých skupinkách, v Americe se shlukují do početných skupin v řádech i desítek tisíc jedinců na jednom místě. U takovýchto kolonií se nákaza šíří daleko rychleji. Netopýři se také navzájem budí, chaoticky vylétávají z jeskyní a zbytečně si spotřebovávají své tukové zásoby (Martinkova et al., 2010; Wibbelt et al., 2010). Dle třetího scénáře způsobuje houba úhyn netopýřů teprve po oslabení jejich imunity jiným patogenem, například virem či bakterií. V takovém případě bychom mikrobiálnímu složení na povrchu netopýřů a zejména jeho odlišnostem v Evropě a v Americe měli přikládat daleko větší význam, protože další případné snížení celkového počtu netopýřů by mělo enormní dopad na zemědělství a šíření chorob po celém světě (Puechmaille et al., 2010), jelikož jsou netopýři významnými predátory hmyzu regulující jeho populace (Williams-Guillen et al., 2008).

3. Rod *Pseudogymnoascus*

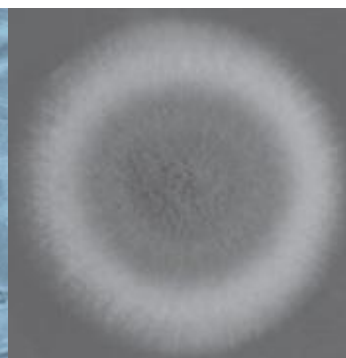
Původně bylo několik druhů tohoto rodu zařazeno do rodu *Geomyces* (Gargas et al., 2009; Lorch et al., 2013), avšak nedávné výzkumy prokázaly, že patří do čeledi *Pseudeurotiaceae*, rodu *Pseudogymnoascus*, kam byly následně přeřazeny (Minnis et Lindner, 2013).

3.1. *Pseudogymnoascus destructans*

Jedná se o psychrotolerantní pomalu rostoucí houbu s optimem růstu 14-15°C, v teplotách nad 24°C a pod -10°C již růst pozorován nebyl. Vytváří bílé kolonie, které se po čase zbarvují do šedozelena až zelena. Konidie se tvoří jednotlivě na koncích hyf nebo v krátkých řetězcích na větvených konidioforech, které jsou hladké, tenkostěnné, 35-90 µm dlouhé. Konidie jsou hladké, asymetricky zahnuté, 2-3,5 µm dlouhé, výrazně rýhované na obou koncích a snadno oddělitelné (Gargas et al., 2009).



Obr. 3: Větvený konidiofor *P. destructans* s konidiemi. Převzato od Gargas a kol. (2009)



Obr. 4: Narostlá kolonie *P. destructans*, převzato od Gargas a kol. (2009)

Houba produkuje celou řadu enzymatických látek – kyselou i alkalickou fosfatázu, β -glukosidázu, N-acetyl- β -glukosaminidázu, estarázu, lipázu, lipázu esterázu, proteinázy, ureázu, leucin a valin arylamidázu a naftol-AS-B1-fosfohydrolázu (Chaturvedi et al., 2010). Testování antibiotických látek ukázalo, že je růst *P. destructans* účinně inhibován azoly a amphotericinem B, přičemž tyto látky fungovaly i při nižších teplotách, což je pozitivním poznatkem do budoucna. Naopak vykazovala *P. destructans* rezistenci vůči flucytosinu (Chaturvedi et al., 2011).

3.2. Ostatní druhy rodu *Pseudogymnoascus*

V rámci rodu *Geomyces*, kam byla původně *Pseudogymnoascus destructans* zařazena, bylo z půdy amerických jeskyní izolováno a na základě ITS sekvenování odlišeno mnoho nepopsaných druhů. Popsáno jich bylo celkem 17 (Lorch et al., 2013), ale zatím chybí komplexní monografická studie tohoto rodu. Nejčastěji se jedná o houby žijící v chladných oblastech, se schopností přežít i v extrémních podmínkách co se týče nízké teploty a salinity (Kochkina et al., 2007).

Pseudogymnoascus pannorum (též dříve znám jako *Geomyces pannorum*) je nejběžněji se vyskytujícím příbuzným *P. destructans*. Může ojediněle způsobit kožní onemocnění u zvířat a člověka (Gianni et al., 2003; Zelenková, 2006), nebo kolonizovat rostliny, jako například kořeny rostliny *Vaccinium* (Vohník et al., 2007), ale jinak je spíše neškodná.



Obr. 5: Hyfy *P. pannorum* kolonizující kořeny rostliny *Vaccinium corymbosum*. Převzato od Vohník (2007)

Izolátů, jež by byly zařaditelné jako *P. pannorum* však v jeskyních izolovali překvapivě málo, většina nálezů představovala právě druhy nepopsané (Lorch et al., 2013). Po přeražení je nejbližším příbuzným druh *Pseudogymnoascus roseus* (Minnis et Lindner, 2013).

4. Interakce hub a bakterií

V německé studii provedené u 486 mrtvých netopýrů napříč 19 různými evropskými druhy bylo zjištěno, že 144 (tedy přibližně třetina) z nich podlehl nějaké chorobě – 54 z nich bakteriální infekci, 5 virové a 2 parazitické. U zbylých 81 netopýrů byly pozorovány středně závažné až těžké patologické změny přesně nezjištěného původu. V případě bakteriálních infekcí bylo detekováno 22 různých druhů bakterií, mezi nimiž převládaly hlavně *Pasteurella multocida*, *Enterococcus faecalis* a *Serratia liquefaciens*. Nejvíce citlivé vůči bakteriálním infekcím byly samičky a mláďata v době kojení a péče o potomstvo (Mühldorfer et al., 2011).

U netopýrů postižených WNS bychom tedy měli kromě přítomnosti patogenní *P. destructans* brát v potaz také další mikrobiální osídlení jejich těla, které by mohlo patogenicitu houby někdy i výrazně ovlivnit, protože jak souhlasí např. Foley a kol. (2011), přestože se *P. destructans* jeví jako jediné infekční agens způsobující WNS, souvislost dalších možných faktorů by měla být zkoumána a zhodnocena.

Houby a bakterie spolu mohou fungovat v nejrůznějších typech soužití od nejjednodušších polymikrobiálních komunit po vysoce specializovaná společenství, která pak dokážou využívat méně bohaté zdroje živin nebo účinněji čelit nepříznivým podmínkám. Například polymikrobiální biofilm tvořený organismy *Candida albicans* a *Staphylococcus epidermidis* zvyšuje rezistenci *S. epidermidis* vůči vankomycinu a *C. albicans* vůči flukonazolům. Obojí nejspíše díky nižší propustnosti těchto látek, kterou smíšený biofilm způsobuje (Adam et al., 2002).

Nejužším a nejdokonalejším typem soužití je symbióza, ať už se jedná o ektosymbiózu, kdy žije bakterie na povrchu svého houbového symbionta, jako např. bakterie rodu *Nostoc* na povrchu lišejníků (Rikkinen et al., 2002), nebo o endosymbiózu, kdy se bakterie nachází přímo uvnitř houbových buněk např. bakterie *Burkholderia* v hyfách houby *Mortierella elongata* (Sato et al., 2010). V některých případech dokonce bakterie žijí ve speciálních vacích vytvořených houbou, které se od její ostatní tkáně morfologicky liší. To je třeba případ bakterie *Nostoc punctiforme* a houby *Geosiphon pyriformis* (Lumini et al., 2006). Bakterie žijící endosymbioticky jsou často na houbě natolik závislé, že je nemožné je z houby izolovat a kultivovat samostatně na médiu (Jargeat et al., 2004).

Dalším kontaktním typem soužití je tvorba smíšených biofilmů sdružujících houby a bakterie pomocí exkretovaných makromolekul, jaké dané organismy nevytvářejí, dokud žijí pouze samostatně (Donlan et Costerton, 2002). Tyto biofilmy najdeme téměř všude. V souvislosti s člověkem se nejčastěji setkáváme s jejich negativním dopadem na jeho zdraví. Například v souvislosti s jejich tvorbou na lidských protézách, implantátech či lékařských pomůckách (Dickinson et Bisno, 1993; Oosterhof et al., 2006) nebo třeba jako s doprovodnou infekcí pacientů s cystickou fibrózou (Gilligan, 1991). Struktura a vlastnosti biofilmů totiž bakteriím zajišťují vyšší odolnost vůči mechanickému odstranění i léčbě antibiotiky (Adam et al., 2002; Harriott et Noverr, 2010).

Ke zformování společenstev hub a bakterií dochází zprvu pomocí vylučování látek, které způsobí pozitivní chemotaxi partnerského organismu. Např. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* vylučuje látky, které působí jako chemoatraktanty pro bakterii *Pseudomonas fluorescens*, která následně kolonizuje (tvoří laterálně připojené mikrokolonie) hyfy daného druhu rodu *Fusarium* (de Weert et al., 2004), houby, která se vyskytuje v rhizosféře rajčat a způsobuje jejich hnilobu (Chin-A-Woeng et al., 1998). Hlavním chemoatraktantem byla v tomto případě prokázána kyselina fusariová (de Weert et al., 2004).

Chemotaxe je pro kolonizaci klíčová. Bakterie jsou díky ní přiváděny blíže k houbě, tedy ke zdroji živin, hlavně aminokyselin, organických kyselin a cukrů (de Weert et al., 2004). Organismy se pak navzájem rozpoznávají pomocí receptorů či polysacharidů na svém povrchu (Brand et al., 2008; Holmes et al., 1996).

4.1. Typy interakcí

4.1.1. Přímé působení extrolitů

Bakterie i houby jsou schopné do svého okolí uvolňovat látky, které mohou jak negativně tak pozitivně působit na ostatní organismy.

Uvolněním antibiotik okolní organismus poškozují nebo dokonce zabíjejí, pokud u něj nedojde ke tvorbě obranných mechanismů – k vyvinutí rezistence na dané antibiotikum nebo k jeho zneškodnění či kompletnímu vyloučení z těla. Jako např. u houby *Botrytis cinerea*, u níž fenaziny a fluoroglucinoly, sekundární metabolity produkované bakterií *Pseudomonas*, indukují zvýšenou tvorbu ABC transportérů, jimiž *B. cinerea* následně tyto pro ni škodlivé látky vylučuje (Schouten et al., 2008).

Kromě antibiotik mohou bakterie i houby uvolňovat spoustu dalších látek, jejichž účinkem není usmrcení partnera, ale změna jeho tvaru, fyziologie či schopnosti komunikace. Tak je tomu například u *Candida albicans*, jež pomocí farnesolu, nenasyčeného sesquiterpenu, snižuje produkci PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), signální molekuly *Pseudomonas aeruginosa*, jež zajišťuje souhrnnou odpověď na podnět, tedy tzv. „quorum sensing“ v rámci její populace (Cugini et al., 2007). Následkem toho je snížena také tvorba pyocyaninů, bakteriálních látek, které jsou pro *C. albicans* toxické. Ta se tímto účinně brání snížení životnosti stran *P. aeruginosa* (Kerr et al., 1999). Na zvýšeném růstu hub se mohou spolu s bakteriemi podílet také další organismy, zejména hostitelské rostliny. Například bakterie žijící uvnitř lýkožrouta *Dendroctonus valens* společně s α -pineny, látkami uvolňovanými hostitelským stromem, vytvářejí podmínky stimulující růst houby *Leptographium procerum*, která je důležitým symbiontem těchto lýkožroutů (Adams et al., 2009).

4.1.2. Modifikace okolního prostředí

Bakterie a houby se také mohou nepřímo ovlivňovat změnami vnějších podmínek, ke kterým dochází díky jejich působení. Nejčastěji bývá ovlivněno okolní pH. Jak například ukázali Romano a Kolter (2005), pokud byla bakterie *Pseudomonas putida* pěstována sama v hroznovém džusu, dosáhla růstem stacionární fáze a poté rychle uhynula. Pokud s ní však byla zároveň kultivována také kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, bakteriální kolonie vydržely růst ještě alespoň dva dny. Díky omezenému zdroji glukózy totiž *P. putida* tolik nesnižuje pH prostředí tvorbou velkého množství kyselých metabolitů, které by vedlo k rychlejšímu úhynu kolonie.

Při výrobě zrajících sýrů zase dochází přímo činností kvasinek ke snižování kyselosti povrchu, díky čemuž může být následně kolonizován -vůči nízkému pH citlivými- bakteriemi jako např. *Atrhrobacter* či *Corynebacterium*, které jsou nezbytné k dokončení procesu zrání (Corsetti et al., 2001).

4.1.3. Kompetice o živiny

Bakterie a houby spolu také navzájem soupeří o živiny, například *Collimonas fungivorans* a *Aspergillus niger* o zdroj dusíku (Mela et al., 2011). Dalším příkladem jsou nepatogenní kmeny houby *Fusarium oxysporum*. Ty v přítomnosti bakterie *Pseudomonas putida* daleko účinněji inhibují kmeny patogenní, které způsobují rostlinnou

chorobu fusariové vadnutí (Park et al., 1988), a to díky vzájemné kompetici o železo, které *P. putida* využívá k produkci látky pseudobactin-358 (Lemanceau et al., 1992).

4.2. Metody studia interakcí

Nejčastějším typem studia interakcí mezi houbami a bakteriemi je jejich společný výsev na médium, následná kokultivace a poté vyhodnocení narostlých kolonií a případných inhibičních zón růstu, ať už ze strany houby nebo bakterie. Výsev by měl být trojího typu, jako je tomu například u El-Aziziho a kol. (2004), kdy jsou bakterie a houba jednak vysety zároveň, jednak vždy jeden z nich přidán do již narostlé kultury druhého organismu. Některé bakterie a zejména houby se totiž vyznačují pomalým růstem, což může zapříčinit nesprávné vyhodnocení interakce jako falešně negativní. Důležitý je také výběr média, na kterém budeme dané organismy kultivovat.

Kromě vizuálního zhodnocení kultur se používá např. měření koncentrace PLFA (phospho-lipid fatty acids) (Andersson et al., 2000), které koreluje s množstvím biomasy jednotlivých organismů. Jeho úbytek při kokultivaci houby a bakterie pak znamená, že byl růst druhým organismem potlačen. Pro studium metabolitů, jimiž na sebe organismy navzájem působí, se používají rekombinované DNA mutanty, jejichž zkoumáním se prokazuje tvorba daného metabolitu, jestli je inhibiční účinek dán vskutku přítomným organismem či jestli je přítomnost daného organismu pro konkrétní účinek vskutku potřebná (Dowling et Ogara, 1994). V dnešní době máme daleko více možností studia vzájemných interakcí, zejména díky rozvinutým sekvenačním technologiím (Nelson et al.).

Pro měření čistě houbového růstu se používá stanovení ergosterolu, hlavní sterolové složky houbových membrán, pomocí HPLC a měření absorbance při vlnové délce 282 nm. Tato metoda je daleko citlivější a rychlejší, než stanovení chitinu či sekundárních metabolitů, jež byly dříve používané jako stanovovací metody (Seitz et al., 1979). Houbová mycelia a spory obsahují vždy dané množství ergosterolu, musíme však brát v potaz různou velikost buněk i spor mezi jednotlivými druhy (Miller et Young, 1997). Stanovením ergosterolu spolehlivě odlišíme houbovou biomasu od rostlinné, živočišné či bakteriální, jeho nevýhodou však zůstává, že nerozpoznáme, kolik a jaké druhy hub se ve vzorku vyskytují (Seitz et al., 1979).

Přehled metod studia interakcí podává Tabulka 1, již najdete níže, založená na excerpci 20 vědeckých prací, v nichž jsou studovány interakce bakterií, hub a případně dalších organismů.

4.3. Diskuse k tabulce

Pokud nebyly v rámci studia sledovány další proměnné (označeno v příslušném sloupci), znamená to, že byla pouze měřena velikost rostoucích kolonií na médiu a sledován případný inhibiční účinek stran houby či bakterie. Jak je z výsledků patrné, většina prací se věnovala důkladnějšímu zkoumání a dalšími metodami ať už přímo či nepřímo stanovovala množství bakteriální a/nebo houbové biomasy.

Pro přípravu kultivačního média ke zkoumání interakcí bakterií s *Pseudogymnoascus destructans*, musíme brát v potaz nutné aspekty jejího růstu, zejména přizpůsobit teplotní podmínky. Např. kvůli rodu *Candida*, známému lidskému patogenu, je teplota kokultivace nastavena na 30°C a výše pro dosažení jejího růstového optima. U *P. destructans* je tato optimální teplota okolo 14°C. Ovšem i v chladnějších podmínkách bude většina bakterií vykazovat daleko rychlejší růst, proto je potřeba kulturu *P. destructans* zaočkovat bakterií až po určité době (dny až týdny) jejího samostatného růstu, abychom zajistili jejich souběžný růst a skutečně relevantní výsledky.

Houba	Bakterie	Habitat	Médium kokultivace	Teplota (°C)/čas (h)	Další sledované proměnné	Autor
<i>Glomus mosseae</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	cévnaté rostliny	polní půda	21/16, 15/8	ne (viz text)	Barea a kol. (1998)
<i>Glomus mosseae</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>	25/16, 19/8	zabudování P do rostliny	Toro a kol. (1998)
<i>Humicola sp.</i>	různé	<i>Phagus</i> - listy	různé zdroje uhlíku	35/20	enzymatické dráhy	Moller a kol. (1999)
<i>Pleurotus sp., Dichomitus sp.</i>	půdní bakterie	půda	MEA	25/24, 48, 140, 196, 336	pH	Lang a kol. (2000)
půdní houby	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Hordeum</i>	Si písek + sláma z ječmene	25/ –	enzymatické dráhy	Sengelov a kol. (2000)
<i>Penicillium sp., Trichoderma sp.</i>	<i>Bacillus subtilis, B. mycoides</i>	<i>Camellia spp.</i>	čajovníková půda	30/24	pH a teplotní tolerance	Pandey a kol. (2001)
<i>Lactarius rufus</i>	různé	<i>Pinus sylvestris</i>	MMN s kořeny <i>P. sylvestris</i>	20/336	soubor obecných charakteristik	Poole a kol. (2001)
<i>Pisolithus alba</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Acacia holosericea</i>	výřezy houby na TSB	25/72	délka rostlinných kořenů	Founoune a kol. (2002)
vodní hyfomycety	různé G-	spadané listí	PYG	15/ 96	ne (viz text)	Gulis a Suberkropp (2003)
<i>Glomus clarum</i>	izolované ze spor <i>G. clarum</i>	neuvedeno	TSA	27/24	délka rostlinných kořenů	Xavier a Germida (2003)
<i>Candida spp.</i>	různé	neuvedeno	RPMI	35/24-48	ne (viz text)	El-Azizi a kol. (2004)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	neuvedeno	hroznová šťáva, YP, LB	30/24-140	pH, enzymatické dráhy	Romano a Kotler (2005)
Ascomycota	různé	<i>Oryza sativa</i>	YMB	28/240	pH, produkce IAAS	Bandara a kol. (2006)
<i>Penicillium sp.</i>	různé	neuvedeno	TYG	17, 25, 30, 34, 37/24	spektrum mykotoxinů	Khaddor a kol. (2007)
<i>Glomus clarum</i>	nitrifikační bakterie	<i>Oryza sativa</i>	médium s antibiotiky	28/140	délka rostlinných kořenů	Raimam a kol. (2007)
<i>Amanita muscaria</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Picea abies</i>	MMN	20/168	struktura endoskeletu	Schrey a kol. (2007)
<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	neuvedeno	YPD	30/24-48	množství pyocyaninu	Brand a kol. (2008)
<i>Glomus spp., Microdochium sp.</i>	<i>Pseudomonas sp., Paenibacillus sp.</i>	<i>Triticum aestivum</i>	PDA	20-22/128	délka rostlinných kořenů	Jaderlund a kol. (2008)
<i>Cladosporium herbarum</i>	izolované z hyf <i>C. herbarum</i>	tlející listí	agar + listový extrakt	18/ –	soubor obecných charakteristik	Baschien a kol. (2009)
<i>Scleroderma sp., Laccaria sp.</i>	<i>Burkholderia sp., Collimonas sp.</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	rašelina + vermikulit	22/16, 15/8	obsah minerálních látek	Koele a kol. (2009)

Tabulka 1:Přehled podmínek a používaných metod při studiu interakcí hub a bakterií.

Soubor obecných charakteristik zahrnuje především morfologický popis, zvýraznění pomocí barvení a měření respirace

5. Rod *Pseudomonas*

V souvislosti s netopýry byl rod *Pseudomonas* nalezen již v jeskynních mikrobiálních populacích například ve španělské netopýří jeskyni u města Zuheros (De Leo et al., 2012).

V laboratoři Genetiky a metabolismu hub AVČR pak probíhá studium bakteriální diversity a interakcí na povrchu netopýří kůže (grant GAČR P506/12/1064, Adaptace netopýřů na plísňové onemocnění geomykózu). Předběžné výsledky tohoto výzkumu ukazují souvislost mezi mírou infekce houbou a složením bakteriálního společenstva, zejména pak odhalují fakt, že díky některým bakteriím rodu *Pseudomonas* dochází k inhibici růstu *P. destructans*, a to v přítomnosti *Pseudomonas libanensis*, *P. syrocantha*, *P. rhodensiae*, a *P. putida*.

5.1. Vliv na ostatní organismy

O některých bakteriích rodu *Pseudomonas* je známo, že významně ovlivňují okolní organismy, zejména houby. Inhibiční účinek této bakterie byl prokázán již dříve, například u *P. Aeruginosa* v plicích pacientů postižených cystickou fibrózou. Jejich oslabené dýchací cesty jsou často napadány druhotnými infekcemi (Gilligan, 1991), například aspergillózou způsobenou druhem *Aspergillus fumigatus*. Ukázalo se, že *P. Aeruginosa* inhibuje růst jeho hyf a výrazně redukuje tvorbu jeho biofilmu látkami jako decanol, dodecanol a decanoová kyselina (Mowat et al., 2010). A právě díky svým inhibičním účinkům vůči houbám slouží jako účinný prostředek pro biologickou kontrolu důležitých plodin (Dowling et Ogara, 1994), které často bývají napadány právě houbami, jako třeba v případě hniloby rajčat způsobené patogenní houbou *Fusarium oxysporum* (Chin-A-Woeng et al., 1998).

5.2. Antifungální sekundární metabolity

Pyocyaniny jsou hlavními antifungálními látkami zejména u druhu *P. aeruginosa*. Například u houby druhu *Candida albicans* zabraňují jejímu přechodu z kvasinkového do vláknitého stavu, který umožňuje její tkáňovou invazivitu. Tak je potlačeno rozvinutí kandidázy, houbového onemocnění u pacientů oslabených cystickou fibrózou (Kerr et al., 1999).

Spolu s pyocyaniny pak fenazinmetosulfát a fenazin-1-karboxylát znemožňují růst *C. albicans* na nefermentovatelných zdrojích uhlíku a specificky inhibují respiraci. V důsledku toho mají pak houbové biofilmy sníženou životaschopnost a odolnost, díky čemuž se jich pak můžeme snadněji zbavit (Morales et al., 2013).

Mimo výše zmíněných existují ještě další látky, jimiž bakterie rodu *Pseudomonas* inhibují růst či fyziologii hub. Např. 3-oxo-C12 homoserin lakton, jenž také inhibuje vláknitý růst *C. albicans* (Hogan et al., 2004). Všem těmto látkám by se vědci v souvislosti s možným potlačením houbové nákazy netopýrů měli blíže věnovat.

6. Závěr

Cílem této práce bylo seznámit se Syndromem bílého nosu, houbovým onemocněním netopýrů, které je pro netopýří populace na americkém kontinentě velmi závažné a působí zde velké ztráty. Dále představit jeho původce, psychrofilní houbu *Pseudogymnoascus destructans* a její příbuzné druhy. Poté shrnout poznatky o typech interakcí, které vůči sobě mohou bakterie a houby vykazovat, a v souvislosti s nimi krátce představit bakteriální rod *Pseudomonas* a jeho antifungální účinky. Ty se v dnešní době hojně využívají např. pro biologickou ochranu důležitých užitkových plodin před houbovými nákazami a díky dalšímu intenzivnímu zkoumání by se mohly v budoucnosti začít používat právě také pro léčbu houbové infekce netopýrů.

7. Použitá literatura

- Adam, B., Baillie, G.S., et Douglas, L.J. (2002). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology* 51, 344-349.
- Adams, A.S., Currie, C.R., Cardoza, Y., Klepzig, K.D., et Raffa, K.F. (2009). Effects of symbiotic bacteria and tree chemistry on the growth and reproduction of bark beetle fungal symbionts. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 39, 1133-1147.
- Andersson, B.E., Welinder, L., Olsson, P.A., Olsson, S., et Henrysson, T. (2000). Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipid fatty acids. *Bioresource Technology* 73, 29-36.
- Bandara, W., Seneviratne, G., et Kulasoorya, S.A. (2006). Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *Journal of Biosciences* 31, 645-650.
- Barea, J.M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O'Gara, F., et Azcon-Aguilar, C. (1998). Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2304-2307.
- Baschien, C., Rode, G., Bockelmann, U., Gotz, P., et Szewzyk, U. (2009). Interactions between hyphosphere-associated bacteria and the fungus *Cladosporium herbarum* on aquatic leaf litter. *Microbial Ecology* 58, 642-650.
- Blehert, D.S. (2012). Fungal disease and the developing story of bat white-nose syndrome. *Plos Pathogens* 8.
- Blehert, D.S., Hicks, A.C., Behr, M., Meteyer, C.U., Berlowski-Zier, B.M., Buckles, E.L., Coleman, J.T.H., Darling, S.R., Gargas, A., Niver, R., et al. (2009). Bat white-nose syndrome: An emerging fungal pathogen? *Science* 323, 227-227.
- Brand, A., Barnes, J.D., Mackenzie, K.S., Odds, F.C., et Gow, N.A.R. (2008). Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Fems Microbiology Letters* 287, 48-55.
- Corsetti, A., Rossi, J., et Gobbetti, M. (2001). Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69, 1-10.
- Courtin, F., Stone, W.B., Risatti, G., Gilbert, K., et Van Kruiningen, H.J. (2010). Pathologic findings and liver elements in hibernating bats with white-nose syndrome. *Veterinary Pathology* 47, 214-219.
- Cryan, P.M., Meteyer, C.U., Boyles, J.G., et Blehert, D.S. (2010). Wing pathology of white-nose syndrome in bats suggests life-threatening disruption of physiology. *Bmc Biology* 8.

- Cugini, C., Calfee, M.W., Farrow, J.M., Morales, D.K., Pesci, E.C., et Hogan, D.A. (2007). Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular Microbiology*, pp. 896-906.
- De Leo, F., Iero, A., Zammit, G., et Urzi, C.E. (2012). Chemoorganotrophic bacteria isolated from biodeteriorated surfaces in cave and catacombs. *International Journal of Speleology* 41, 125-136.
- de Weert, S., Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Lamers, G.E.M., et Lugtenberg, B.J.J. (2004). Role of chemotaxis toward fusaric acid in colonization of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 1185-1191.
- Dickinson, G.M., et Bisno, A.L. (1993). Infections associated with prosthetic devices - clinical considerations. *International Journal of Artificial Organs* 16, 749-754.
- Donlan, R.M., et Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 167-+.
- Dowling, D.N., et Ogara, F. (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant-disease. *Trends in Biotechnology* 12, 133-141.
- El-Azizi, M.A., Starks, S.E., et Khardori, N. (2004). Interactions of *Candida albicans* with other *Candida spp.* and bacteria in the biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1067-1073.
- Foley, J., Clifford, D., Castle, K., Cryan, P., et Ostfeld, R.S. (2011). Investigating and managing the rapid emergence of white-nose syndrome, a novel, fatal, infectious disease of hibernating bats. *Conservation Biology* 25, 223-231.
- Founoune, H., Duponnois, R., Ba, A.M., Sall, S., Branget, I., Lorquin, J., Neyra, M., et Chotte, J.L. (2002). Mycorrhiza helper bacteria stimulated ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba*. *New Phytologist* 153, 81-89.
- Frick, W.F., Pollock, J.F., Hicks, A.C., Langwig, K.E., Reynolds, D.S., Turner, G.G., Butchkoski, C.M., et Kunz, T.H. (2010). An emerging disease causes regional population collapse of a common north american bat species. *Science* 329, 679-682.
- Gargas, A., Trest, M.T., Christensen, M., Volk, T.J., et Blehert, D.S. (2009). *Geomyces destructans* sp nov associated with bat white-nose syndrome. *Mycotaxon* 108, 147-154.
- Gianni, C., Caretta, G., et Romano, C. (2003). Skin infection due to *Geomyces pannorum* var. *pannorum*. *Mycoses* 46, 430-432.
- Gilligan, P.H. (1991). Microbiology of airway disease in patients with cystic-fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 35-51.
- Gulis, V., et Suberkropp, K. (2003). Interactions between stream fungi and bacteria associated with decomposing leaf litter at different levels of nutrient availability. *Aquatic Microbial Ecology* 30, 149-157.

- Harriott, M.M., et Noverr, M.C. (2010). Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 3746-3755.
- Hogan, D.A., Vik, A., et Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular Microbiology* 54, 1212-1223.
- Holmes, A.R., McNab, R., et Jenkinson, H.F. (1996). *Candida albicans* binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin-receptor interactions. *Infection and Immunity* 64, 4680-4685.
- Chaturvedi, S., Rajkumar, S.S., Li, X., Hurteau, G.J., Shtutman, M., et Chaturvedi, V. (2011). Antifungal testing and high-throughput screening of compound library against *Geomyces destructans*, the etiologic agent of geomycosis (WNS) in bats. *Plos One* 6.
- Chaturvedi, V., et Chaturvedi, S. (2011). Editorial: What is in a name? A proposal to use geomycosis instead of white nose syndrome (WNS) to describe bat infection caused by *Geomyces destructans*. *Mycopathologia* 171, 231-233.
- Chaturvedi, V., Springer, D.J., Behr, M.J., Ramani, R., Li, X.J., Peck, M.K., Ren, P., Bopp, D.J., Wood, B., Samsonoff, W.A., et al. (2010). Morphological and molecular characterizations of psychrophilic fungus *Geomyces destructans* from New York bats with white nose syndrome (WNS). *Plos One* 5.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., van der Bij, A.J., van der Drift, K., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P., Tichy, H.V., et al. (1998). Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 1069-1077.
- Jaderlund, L., Arthurson, V., Granhall, U., et Jansson, J.K. (2008). Specific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria: as revealed by different combinations. *Fems Microbiology Letters* 287, 174-180.
- Jargeat, P., Cosseau, C., Ola'h, B., Jauneau, A., Bonfante, P., Batut, J., et Becard, G. (2004). Isolation, free-living capacities, and genome structure of "*Candidatus glomeribacter gigasporarum*," the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Journal of Bacteriology* 186, 6876-6884.
- Kerr, J.R., Taylor, G.W., Rutman, A., Hoiby, N., Cole, P.J., et Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of Clinical Pathology* 52, 385-387.
- Khaddor, M., Saidi, R., Aidoun, A., Lamarti, A., Tantaoui-Elaraki, A., Ezziyyani, M., Castillo, M.E.C., et Badoc, A. (2007). Antibacterial effects and toxigenesis of *Penicillium aurantiogriseum* and *P. viridicatum*. *African Journal of Biotechnology* 6, 2314-2318.
- Koele, N., Turpault, M.P., Hildebrand, E.E., Uroz, S., et Frey-Klett, P. (2009). Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: Budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 1935-1942.

- Kochkina, G., Ivanushkina, N., Akimov, V., Gilichinskii, D., et Ozerskaya, S. (2007). Halo- and psychrotolerant *Geomyces* fungi from Arctic cryopegs and marine deposits. *Microbiology* 76, 31-38.
- Lang, E., Kleeberg, I., et Zadrazil, F. (2000). Extractable organic carbon and counts of bacteria near the lignocellulose-soil interface during the interaction of soil microbiota and white rot fungi. *Bioresource Technology* 75, 57-65.
- Lemanceau, P., Bakker, P., Dekogel, W.J., Alabouvette, C., et Schippers, B. (1992). Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2978-2982.
- Lorch, J.M., Lindner, D.L., Gargas, A., Muller, L.K., Minnis, A.M., et Blehert, D.S. (2013). A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia* 105, 237-252.
- Lumini, E., Ghignone, S., Bianciotto, V., et Bonfante, P. (2006). Endobacteria or bacterial endosymbionts? To be or not to be. *New Phytologist* 170, 205-208.
- Martinkova, N., Backor, P., Bartonicka, T., Blazkova, P., Cervený, J., Falteisek, L., Gaisler, J., Hanzal, V., Horacek, D., Hubalek, Z., et al. (2010). Increasing incidence of *Geomyces destructans* fungus in bats from the Czech Republic and Slovakia. *Plos One* 5.
- Mela, F., Fritsche, K., de Boer, W., van Veen, J.A., de Graaff, L.H., van den Berg, M., et Leveau, J.H.J. (2011). Dual transcriptional profiling of a bacterial/fungal confrontation: *Collimonas fungivorans* versus *Aspergillus niger*. *Isme Journal* 5, 1494-1504.
- Miller, J.D., et Young, J.C. (1997). The use of ergosterol to measure exposure to fungal propagules in indoor air. *American Industrial Hygiene Association Journal* 58, 39-43.
- Minnis, A.M., et Lindner, D.L. (2013). Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biology* doi: 10.1016/j.funbio.2013.07.001.
- Moller, J., Miller, M., et Kjoller, A. (1999). Fungal-bacterial interaction on beech leaves: influence on decomposition and dissolved organic carbon quality. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 367-374.
- Morales, D.K., Grahl, N., Okegbe, C., Dietrich, L.E.P., Jacobs, N.J., et Hogan, D.A. (2013). Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *Mbio* 4.
- Mowat, E., Rajendran, R., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., Lang, S., et Ramage, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. *Fems Microbiology Letters* 313, 96-102.
- Mühldorfer, K., Speck, S., Kurth, A., Lesnik, R., Freuling, C., Müller, T., Kramer-Schadt, S., et Wibbelt, G. (2011). Diseases and causes of death in European bats: Dynamics in disease susceptibility and infection rates. *Plos One* 6, e29773.

- Nelson, K.E., Weinstock, G.M., Highlander, S.K., Worley, K.C., Creasy, H.H., Wortman, J.R., Rusch, D.B., Mitreva, M., Sodergren, E., Chinwalla, A.T., *et al.* (2010). A catalog of reference genomes from the human microbiome. *Science* 328, 994-999.
- Oosterhof, J.J.H., Buijssen, K., Busscher, H.J., van der Laan, B., et van der Mei, H.C. (2006). Effects of quaternary ammonium silane coatings on mixed fungal and bacterial biofilms on tracheoesophageal shunt prostheses. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3673-3677.
- Pandey, A., Palni, L.M.S., et Bisht, D. (2001). Dominant fungi in the rhizosphere of established tea bushes and their interaction with the dominant bacteria under in situ conditions. *Microbiological Research* 156, 377-382.
- Park, C.S., Paulitz, T.C., et Baker, R. (1988). Biocontrol of fusarium wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 78, 190-194.
- Pikula, J., Bandouchova, H., Novotny, L., Meteyer, C.U., Zukal, J., Irwin, N.R., Zima, J., et Martinkova, N. (2012). Histopathology confirms white-nose syndrome in bats in Europe. *Journal of Wildlife Diseases* 48, 207-211.
- Poole, E.J., Bending, G.D., Whipps, J.M., et Read, D.J. (2001). Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytologist* 151, 743-751.
- Puechmaille, S.J., Verdeyroux, P., Fuller, H., Gouilh, M.A., Bekaert, M., et Teeling, E.C. (2010). White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bat, France. *Emerging infectious diseases* 16, 290.
- Puechmaille, S.J., Wibbelt, G., Korn, V., Fuller, H., Forget, F., Muhldorfer, K., Kurth, A., Bogdanowicz, W., Borel, C., Bosch, T., *et al.* (2011). Pan-European distribution of white-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) not associated with mass mortality. *Plos One* 6.
- Raimam, M.P., Albino, U., Cruz, M.F., Lovato, G.M., Spago, F., Ferracin, T.P., Lima, D.S., Goulart, T., Bernardi, C.M., Miyauchi, M., *et al.* (2007). Interaction among free-living N-fixing bacteria isolated from *Drosera villosa* var. *villosa* and AM fungi (*Glomus clarum*) in rice (*Oryza sativa*). *Applied Soil Ecology* 35, 25-34.
- Reichard, J.D., et Kunz, T.H. (2009). White-nose syndrome inflicts lasting injuries to the wings of little brown myotis (*Myotis lucifugus*). *Acta Chiropterologica* 11, 457-464.
- Rikkinen, J., Oksanen, I., et Lohtander, K. (2002). Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science* 297, 357-357.
- Romano, J.D., et Kolter, R. (2005). *Pseudomonas*-*Saccharomyces* interactions: Influence of fungal metabolism on bacterial physiology and survival. *Journal of Bacteriology* 187, 940-948.

- Sato, Y., Narisawa, K., Tsuruta, K., Umezu, M., Nishizawa, T., Tanaka, K., Yamaguchi, K., Komatsuzaki, M., et Ohta, H. (2010). Detection of betaproteobacteria inside the mycelium of the fungus *Mortierella elongata*. *Microbes and Environments* 25, 321-324.
- Seitz, L.M., Sauer, D.B., Burroughs, R., Mohr, H.E., et Hubbard, J.D. (1979). Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* 69, 1202-1203.
- Sengelov, G., Kowalchuk, G.A., et Sorensen, S.J. (2000). Influence of fungal-bacterial interactions on bacterial conjugation in the residuesphere. *Fems Microbiology Ecology* 31, 39-45.
- Schouten, A., Maksimova, O., Cuestaâ€œArenas, Y., Van Den Berg, G., et Raaijmakers, J.M. (2008). Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broadâ€œspectrum antibiotic 2, 4â€œdiacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* 10, 1145-1157.
- Schrey, S.D., Salo, V., Raudaskoski, M., Hampp, R., Nehls, U., et Tarkka, M.T. (2007). Interaction with mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces sp AcH 505* modifies organisation of actin cytoskeleton in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria* (fly agaric). *Current Genetics* 52, 77-85.
- Simonovicova, A., Pangallo, D., Chovanova, K., et Lehotska, B. (2011). *Geomyces destructans* associated with bat disease WNS detected in Slovakia. *Biologia* 66, 562-564.
- Toro, M., Azcon, R., et Barea, J.M. (1998). The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. *New Phytologist* 138, 265-273.
- Vanderwolf, K.J., McAlpine, D.F., Forbes, G.J., et Malloch, D. (2012). Bat populations and cave microclimate prior to and at the outbreak of white-nose syndrome in New Brunswick. *Canadian Field-Naturalist* 126, 125-134.
- Vohnik, M., Fendrych, M., Albrechtova, J., et Vosatka, M. (2007). Intracellular colonization of *Rhododendron* and *Vaccinium* roots by *Cenococcum geophilum*, *Geomyces pannorum* and *Meliniomyces variabilis*. *Folia Microbiologica* 52, 407-414.
- Wibbelt, G., Kurth, A., Hellmann, D., Weishaar, M., Barlow, A., Veith, M., Pruger, J., Gorfol, T., Grosche, L., Bontadina, F., et al. (2010). White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bats, Europe. *Emerging infectious diseases* 16, 1237-1243.
- Williams-Guillen, K., Perfecto, I., et Vandermeer, J. (2008). Bats limit insects in a neotropical agroforestry system. *Science* 320, 70-70.
- Xavier, L.J.C., et Germida, J.J. (2003). Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 471-478.
- Zelenková, H. (2006). *Geomyces pannorum* as a possible causative agent of dermatomycosis and onychomycosis in two patients. *Acta Dermatovenereologica Croatica* 14, 0-0.